

五味子多糖通过 Traf3/NF- κ B 通路降低脂多糖对大鼠肝细胞的炎症反应

王荣, 张玲莉, 刘莉(武汉大学人民医院, 武汉 430060)

摘要: 目的 探讨五味子多糖对脂多糖(LPS)诱导原代大鼠肝细胞炎症反应的影响, 并研究潜在机制。方法 体外原代培养大鼠肝细胞, 并分为空白对照组、LPS 诱导组、五味子多糖低、中、高剂量组, CCK-8 法检测五味子多糖对大鼠肝细胞增殖的影响, ELISA 法检测五味子多糖对大鼠肝细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 炎症因子的影响, 免疫印迹方法检测五味子多糖对 Traf3/NF- κ B 信号通路的影响。结果 与 LPS 诱导组相比, 五味子多糖能显著改善 LPS 对大鼠肝细胞增殖的抑制作用($P<0.05$); 与 LPS 诱导组相比, 不同剂量五味子多糖均显著降低了大鼠肝细胞分泌的 IL-6 和 TNF- α 炎症因子水平($P<0.05$); 免疫印迹法检测发现, 各剂量五味子多糖组相对 LPS 诱导组细胞中 Traf3 和 p-NF- κ B 表达水平明显降低($P<0.05$)。结论 五味子多糖可抑制大鼠肝细胞炎症反应, 进而改善炎症对细胞增殖的抑制作用, 其作用机制可能与下调 Traf3/NF- κ B 信号通路活化有关。

关键词: 五味子多糖; 大鼠肝细胞; 炎症; 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)12-1699-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.012

引用本文: 王荣, 张玲莉, 刘莉. 五味子多糖通过 Traf3/NF- κ B 通路降低脂多糖对大鼠肝细胞的炎症反应[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1699-1702.

Effects of Schizandrae Polysaccharide on Inflammatory Reaction of LPS-induced Rat Hepatocytes via Traf3/NF- κ B Signaling Pathway

WANG Rong, ZHANG Lingli, LIU Li(Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of schizandrae polysaccharide(SP) on inflammatory reaction of lipopolysaccharide(LPS)-induced rat hepatocytes, and study the potential mechanism. **METHODS** Primary rat hepatocytes were cultured *in vitro*, and hepatocytes were divided into five groups, including control group, LPS-induced group, low dose-, medium dose-, and high dose SP groups. The effect of SP on the proliferation of hepatocytes were investigated using CCK-8 assay. ELISA was used to investigate the influence of SP on the secretory levels of inflammatory cytokine (IL-6 and TNF- α). Western blot was used to assess the impacts of SP on the Traf3/NF- κ B signaling pathway. **RESULTS** SP significantly improved the inhibitory effect of LPS-induced hepatocytes proliferation ($P<0.05$). Varying concentrations of SP could significantly inhibit the secretion of IL-6 and TNF- α in hepatocytes compared with LPS-induced group ($P<0.05$). Western blot results showed that the expression levels of Traf3 and NF- κ B in all SP groups significantly decreased compared with LPS-induced group($P<0.05$). **CONCLUSION** SP can significantly inhibit the inflammatory reaction of rat hepatocytes and its molecular mechanism may involve in down-regulating the activation of Traf3/NF- κ B signaling pathway.

KEY WORDS: schizandrae polysaccharide; rat hepatocytes; inflammation; signaling pathway

五味子系木兰科植物五味子或华中五味子的干燥成熟果实, 是我国传统的中药材, 最早记录于《神农本草经》, 临床上主要用于久咳虚喘、内热消渴、梦遗滑精等^[1-2]。研究表明五味子含有多种药理成分, 其中多糖和木脂素类在抗肿瘤方面效果较佳^[3]。现代药理学研究证实, 五味子不仅对中枢神经系统、心血管系统及免疫系统等均有调节作用, 而且在保护肝脏、抗氧化及抗衰老等方面发挥着重要的作用^[4]。许珂玉等^[5]研究发现五味子多糖提取物对肝细胞具有明显的保护作用, 并且这种作用可能与其拮抗 CCl₄ 毒性代谢产物导致

的脂质过氧化对肝亚细胞结构的损伤有关。肝脏疾病的发生与肝细胞炎症反应、氧化应激等多种致病因素相关, 目前, 五味子多糖对肝细胞炎症的保护作用机制研究较少。因此, 本实验体外培养原代大鼠肝细胞, 用脂多糖(LPS)诱导肝细胞炎症模型, 进一步探讨五味子多糖对肝细胞炎症的保护效应及其作用机制。

1 材料及方法

1.1 材料

五味子多糖(上海信谊天平药业有限公司, 批号: 88415-35-4, 含量 $\geq 99\%$); LPS(Sigma 公司,

作者简介: 王荣, 女, 硕士, 主管护师 Tel: 15002759448 E-mail: 95358196@qq.com

批号: L2880, 含量 $\geq 98\%$); DMEM 高糖培养基(上海吉诺公司); 胎牛血清(四季青生物有限公司, 批号: 20170421); 胰蛋白酶(上海吉诺公司, 批号: 20160912); CCK-8 试剂盒(上海海联生物有限公司, 批号: 20170124); IL-6 及 TNF- α ELISA 试剂盒(武汉华美生物有限公司, 批号: WS35422); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号: P0023S-09); 一抗稀释液(上海谷歌公司); ECL 显色液(Sigma 公司); β -actin、Traf3、NF- κ B 及 p-NF- κ B 一抗均购自美国 Abcam 公司; 二抗羊抗兔 IgG 购自上海谷歌生物有限公司。

1.2 仪器

单人超净工作台(上海苏静实业有限公司); 细胞培养箱(上海印溪仪器仪表有限公司); Victor3 1420 Multilable Counter 酶标仪(美国 BD, FACS AriaIII); HD-3000 凝胶成像仪(上海上天精密仪器有限公司)。

1.3 原代大鼠肝细胞的分离与鉴定

采用改良原位两步非循环灌注法及多次过滤低速离心法分离原代大鼠肝细胞, 常规 DMEM 高糖培养基培养原代大鼠肝细胞, 锥虫蓝拒染法检测接种时肝细胞的存活率, 倒置显微镜动态观察肝细胞形态变化^[6]。

1.4 原代大鼠肝细胞传代培养

利用 DMEM 完全培养基(10%FBS, 1%青霉素-链霉素溶液)培养, 待大鼠肝细胞融合至 90%时开始传代培养, 先弃去旧培养基, 加入无菌的 PBS 清洗细胞 2 遍, 再加入胰蛋白酶进行消化, 显微镜下观察细胞形态变化, 待细胞变圆便加入新鲜培养基终止消化, 离心、重悬细胞, 以 1:3 比例传代培养。

1.5 大鼠肝细胞增殖检测

取对数生长期的大鼠肝细胞, 清洗、消化、重悬细胞后, 以每孔 5×10^3 接种至 96 孔板中, 每组实验设置 6 个复孔, 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养过夜。用不同浓度 LPS(0.1, 0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理细胞, 观察 LPS 对细胞相对存活率的影响, 筛选出最佳的 LPS 浓度, 用于后续实验研究。然后用低 (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 (80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 剂量五味子多糖和 LPS 共同孵育肝细胞, 终体积为每孔 100 μL 。五味子多糖作用 24 h 后, 吸干旧培养基, 每孔加入含 CCK-8 试剂 10 μL 的新鲜培养基 100 μL 。待 CCK-8 试剂与细胞作用

1 h 后, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 OD 值, 并计算肝细胞相对存活率。

1.6 ELISA 法检测细胞上清中 IL-6 及 TNF- α 炎症因子水平

取不同浓度五味子多糖(20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 LPS(1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共培养细胞的上清, 收集于 EP 管中离心 20 min, 转速设定为 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 取上清-20 $^\circ\text{C}$ 冷冻备用。IL-6 及 TNF- α 水平的检测按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行。

1.7 蛋白表达水平检测

取对数生长期的大鼠肝细胞, 清洗、消化、重悬细胞后, 以每孔 5×10^5 接种至 6 孔板中, 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养过夜。20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子多糖和 LPS 共作用细胞, 终体积为每孔 1 mL。药物作用 24 h 后, 收集细胞, 裂解、测定蛋白浓度。细胞裂解液中加入上样缓冲液, 100 $^\circ\text{C}$ 加热煮沸 10 min。电泳时, 每孔上样蛋白量为 40 μg , 在 12%的 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离, 浓缩胶电泳分离时电压设置为 70 V, 分离胶电泳时电压设置为 120 V; 分离完成后在 275 mA 电流转膜 60 min; 再将 NC 膜用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h; 一抗孵育过夜后, 再二抗常温下孵育 1 h, 洗膜 3 次, 显色成像。

1.8 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 五味子多糖对大鼠肝细胞相对存活率的影响

不同浓度 LPS 处理细胞发现, 当浓度 $< 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 LPS 对细胞的存活率没有影响, 但当浓度 $> 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对细胞增殖起着抑制作用, 所以最终确定 LPS 的处理浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结果见图 1。五味子多糖处理原代大鼠肝细胞 24 h 后, 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子多糖对肝大鼠细胞相对存活率的影响相对于对照组无显著变化。五味子多糖对 LPS 诱导炎症引起的肝细胞增殖情况见图 1, LPS 诱导组细胞增殖率显著低于空白对照组 ($P < 0.05$); 而经过 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子多糖作用后, 细胞相对存活率显著高于 LPS 诱导组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。且随着五味子多糖剂量上升, 细胞相对存活率显著上升, 说明五味子多糖呈浓度依赖性影响 LPS 诱导大鼠肝细胞炎

症导致增殖情况的变化。

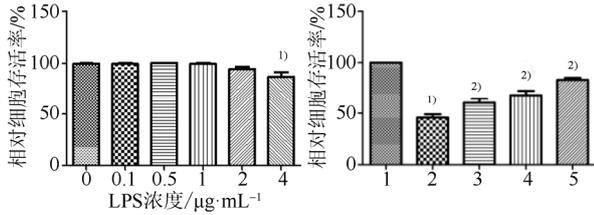


图 1 五味子多糖对大鼠肝细胞增殖影响
1-空白对照组; 2-LPS 诱导组; 3-LPS+低剂量五味子多糖组; 4-LPS+中剂量五味子多糖组; 5-LPS+高剂量五味子多糖组。与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 诱导组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 The effects of schizandrae polysaccharide on the proliferation of rat hepatocytes

1-control group; 2-LPS-induced group; 3-LPS+low dose group; 4-LPS+medium dose group; 5-LPS+high dose group. Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with LPS-induced group, ²⁾ $P<0.05$.

2.2 五味子多糖对 IL-6 及 TNF- α 分泌的影响

五味子多糖孵育原代大鼠肝细胞 24 h 后, 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子多糖对肝细胞分泌 IL-6 及 TNF- α 的影响见图 2。LPS 诱导组肝细胞分泌的 IL-6 及 TNF- α 水平显著高于空白对照组($P<0.05$); 而经过五味子多糖作用后, IL-6 及 TNF- α 分泌水平显著低于 LPS 诱导组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。且随着五味子多糖剂量上升, IL-6 及 TNF- α 分泌水平显著降低, 说明五味子多糖呈浓度依赖性影响 LPS 诱导原代大鼠肝细胞炎症反应。

2.3 五味子多糖对 Traf3/NF- κ B 信号通路活化的影响

五味子多糖对大鼠肝细胞中 Traf3/NF- κ B 信号通路影响情况的影响见图 3。结果表明, LPS 诱导组中 Traf3 表达水平及 NF- κ B 磷酸化水平显著高于空白对照组($P<0.05$), 说明 LPS 可诱导 Traf3/NF- κ B 信号通路活化引起炎症反应。经过 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子多糖处理后, Traf3 表达水平及 NF- κ B 磷酸化水平显著低于 LPS 诱导

组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。且随着五味子多糖剂量上升, Traf3 表达水平及 NF- κ B 磷酸化水平显著降低, 说明五味子多糖呈浓度依赖性影响 LPS 诱导大鼠肝细胞中 Traf3/NF- κ B 信号通路活化。

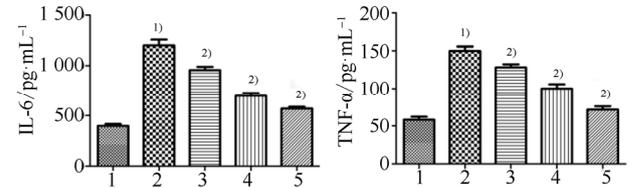


图 2 五味子多糖对大鼠肝细胞分泌炎症因子的影响
1-空白对照组; 2-LPS 诱导组; 3-LPS+低剂量五味子多糖组; 4-LPS+中剂量五味子多糖组; 5-LPS+高剂量五味子多糖组。与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 诱导组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 The effects of schizandrae polysaccharide on the secretory levels of inflammatory cytokine in rat hepatocytes

1-control group; 2-LPS-induced group; 3-LPS+low dose group; 4-LPS+medium dose group; 5-LPS+high dose group. Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with LPS-induced group, ²⁾ $P<0.05$.

3 讨论

肝炎常常导致后期的肝硬化、肝纤维化及肝癌的发生, 因此, 对肝脏炎症进行预防治疗具有较好临床价值。目前研究较多的是病毒所导致的肝炎, 而中药对肝细胞炎症反应的作用机制研究较少^[7]。因此, 本实验从细胞水平研究了五味子多糖对大鼠肝细胞炎症治疗的分子机制, 以期为后期的临床应用奠定基础。原代培养大鼠肝细胞, 采用 LPS 诱导构建细胞炎症模型。结果发现 LPS 诱导组细胞增殖率显著低于空白对照组($P<0.05$), 并且炎症因子 IL-6 及 TNF- α 分泌水平显著高于空白对照组($P<0.05$), 说明细胞炎症模型构建成功。接着利用 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子多糖与 LPS 共同作用细胞, 结果发现不同浓度五味子多糖均能显著升高大鼠肝细胞的相对存活率, 并且明显降低了细胞中炎症因子 IL-6 及 TNF- α 的分泌, 说明五味子多糖可以改善大鼠肝细胞的炎症反应。

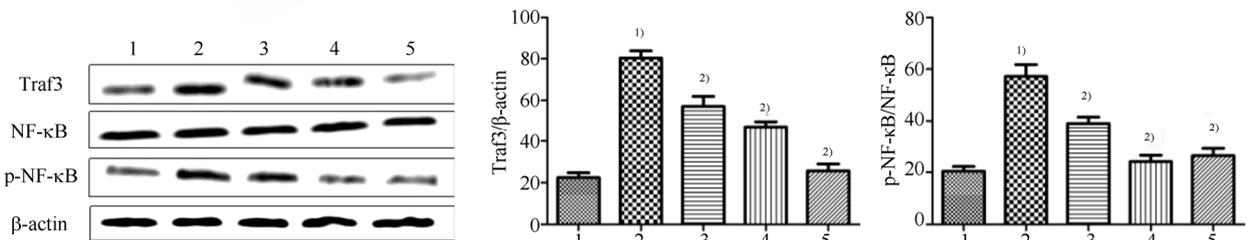


图 3 五味子多糖对大鼠肝细胞 Traf3/NF- κ B 信号通路活化的影响
1-空白对照组; 2-LPS 诱导组; 3-LPS+低剂量五味子多糖组; 4-LPS+中剂量五味子多糖组; 5-LPS+高剂量五味子多糖组。与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 诱导组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 The effects of schizandrae polysaccharide on the activation of Traf3/NF- κ B signaling pathway in rat hepatocytes
1-control group; 2-LPS-induced group; 3-LPS+low dose group; 4-LPS+medium dose group; 5-LPS+high dose group. Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with LPS-induced group, ²⁾ $P<0.05$.

研究证实革兰氏阴性菌中的 LPS 可通过与 Toll 样受体 4(TLR4)结合,导致下游多种炎症信号通路的活化^[8]。细胞核因子(NF- κ B)在炎症反应的发生过程中起着关键性的作用, NF- κ B 活化后可向细胞核内转移,并编码多种细胞因子的表达,调控炎症基因的表达来调节免疫反应^[9-11]。Traf3 衔接蛋白不仅可以被膜上多种受体激活,包括 TNF 受体家族及 Toll/IL 受体家族等,从而进一步激活下游的多种通路。LPS 刺激可引起 Traf3 的泛素化,接着与转化生长因子 β 活化激酶 1(TAK1)形成复合物,进一步激活 IKKs,促使了 NF- κ B 向细胞核内的转移,导致炎症反应的发生^[12]。研究发现 LPS 刺激大鼠肝细胞后, Traf3 表达水平及 NF- κ B 磷酸化水平显著升高,而经过 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子多糖处理细胞后 Traf3 及 p-NF- κ B 表达水平显著降低。说明五味子多糖可通过抑制 Traf3/NF- κ B 信号通路的活化降低炎症反应。综上所述,五味子多糖可通过抑制大鼠肝细胞 Traf3/NF- κ B 信号通路的活化,从而抑制细胞炎症因子的分泌,达到抗炎的效果。

REFERENCES

- [1] GAN L. Regulating effect of fructus schisandrae polysaccharide on tumor growth and immune function of H₂₂ vaccination mice [J]. Immunol J(免疫学杂志), 2013, 29(10): 867-870.
- [2] CUI C H, SUN S Y, CUI S M. Determination of plasticizers in *Schisandra chinensis* oil [J]. Phram Today(今日药学), 2016, 26(10): 717-720.
- [3] 张建国, 范苗波. 五味子多糖的研究概况[J]. 黑龙江科技信

息, 2013, 5(3): 44-46.

- [4] LIANG J, HOU H Y, LAN X X, et al. Advance in study on pharmacological effect and molecular mechanisms of schisandrins B [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2014, 31(4): 506-510.
- [5] 许珂玉, 柳春. 五味子多糖对 CCl₄ 诱导的肝损伤大鼠亚细胞水平的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(4): 1352-1354.
- [6] YE J, WANG Q, FU X, et al. Isolation, culture and identification of hepatocytes of primary rat [J]. J Appl Clin Pediatrics(实用儿科临床杂志), 2012, 21(7): 531-533.
- [7] NARSALE AA, ENOS R T, PUPPA M J, et al. Liver inflammation and metabolic signaling in ApcMin/+ mice: The role of cachexia progression [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119888. Doi: 10.1371/journal.pone.0119888
- [8] YAO L, KAN E M, LU J, et al. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: Role of TLR4 in hypoxic microglia [J]. J Neuroinflammation, 2013, 10(12): 23-29.
- [9] WANG S, WANG H, JING H, et al. Anti-inflammatory effects of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from danshen, on activated microglia [J]. Chin J Physiol, 2012, 55(21): 428-434.
- [10] LI P R, YOU S M, SHEN Y B. Effect of dihydromyricetin on mice with ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2017, 36(5): 268-274.
- [11] DILSHARA M G, LEE K T, JAYASOORIYA R G, et al. Downregulation of NO and PGE₂ in LPS-stimulated BV2 microglial cells by trans-isoferulic acid via suppression of PI3K/Akt-dependent NF- κ B and activation of Nrf2-mediated HO-1 [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 18(11): 203-211.
- [12] SONG F J, ZENG K, LIAO L X, et al. Schizandrin a inhibits microglia mediated neuroninflammation through inhibiting TRAF6-NF- κ B and Jak2-Stat3 signaling pathways [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149991. Doi: 10.1371/journal.pone.0149991.

收稿日期: 2017-06-03

(本文责编: 曹粤锋)